

Tumor cell plasticity: vascularisation beyond angiogenesis

Citation for published version (APA):

Hillen, F. (2008). Tumor cell plasticity: vascularisation beyond angiogenesis. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Tumor growth is mainly restricted due to the diffusion limit of oxygen and nutrients. In order to grow beyond a size of 1-2 mm³, the tumour switches to an angiogenic phenotype and attracts blood vessels from the surrounding stroma. Angiogenesis, the growth of new capillary vessels out of pre-existing ones, is regulated by a variety of pro- and anti-angiogenic factors, and is a prerequisite for further outgrowth of the tumor and for metastasis formation. With the discovery of the first angiogenic growth factors, 30 years ago, researchers postulated optimistically that the inhibition of angiogenesis in tumors could be a challenging and promising strategy in treatment of cancer. However, clinical trials did show limited results in comparison to the initial mouse studies. In 1999, the process of vasculogenic mimicry, in which tumor cells of aggressive tumors dedifferentiate into an endothelial phenotype and make tube-like structures, was discovered. This mechanism provides tumour cells with a secondary circulation system of vasculogenic structures lined by tumour cells, independently of angiogenesis, and contributes to the aggressiveness of a tumor. The presence of vasculogenic mimicry in tumor samples of patients has been correlated to poor survival in several tumor types. The recent findings on the 'plastic' endothelial-like phenotype of melanoma and other tumour cells confused the field of cancer biology. The presence of vasculogenic mimicry could (partly) explain the limited success of anti-angiogenesis strategies, since these treatments are targeting tumor specific endothelial cells and not tumor cells. Little is known about the role of this secondary circulation system in tumors. In this thesis, the role of vasculogenic mimicry in tumor biology was investigated.

In chapter 2, we described different vascularisation types that are present in solid tumors. It is clear now that tumors, next to sprouting angiogenesis, have different forms of tumor vasculature that stimulate tumor progression and metastasis. Processes including intussusceptive angiogenesis, the recruitment of endothelial progenitor cells, vessel co-option, vasculogenic mimicry and lymphangiogenesis, are also important for tumor outgrowth. We summarize the different mechanisms of tumour vascularisation, the molecular players that are involved and their relevance in clinical practice. While most research has been done on sprouting angiogenesis, the exact mechanisms that are involved in other types of vascularisation are less known. Nevertheless, these mechanisms contribute to tumor blood circulation and are important targets for therapy. Finally, we anticipate that combination of a multimodal anti-vascular approach, representing anti-angiogenesis, anti-lymphangiogenesis and vasculogenic mimicry targeting, together with chemotherapy may become the best possible strategy in the fight against cancer.

To investigate the relationship between vasculogenic mimicry, angiogenesis and the immune system in tumors, 58 patients with a primary melanoma were selected. By

means of immunohistochemistry on tumor samples we got insight in the relationship between these 3 processes and their contribution to tumor progression. In chapter 3, we described a new technique to quantify the amount of active angiogenesis. To accomplish this we used a immunohistochemical double staining, in which we stained both the blood vessels (with CD31/CD34) and the proliferating cells (with Ki-67 antibody) in a tumor. We found that the amount of proliferating endothelial cells was a better parameter for patient survival than quantifying only the amount of blood vessels.

In chapter 4, we analysed the role of immune infiltration (T cells, cytotoxic T cells, B cells, macrophages, polymorphonuclear cells, regulatory T cells and activation status of lymphocytes) in tumor progression and the correlation with the amount of active angiogenesis and the presence of vasculogenic mimicry. Both the amount of immune infiltration and the presence of vasculogenic mimicry were correlated with the aggressiveness of the tumor. In addition, the amount of activated lymphocytes (CD69) is an important parameter to analyse the functionality of the immune reaction of the tumor.

In chapter 5, we described the presence of vasculogenic mimicry in Ewing sarcoma. This tumor is a rare, but aggressive type of cancer characterised by the large numbers of blood lakes (erythrocytes surrounded by tumor cells). Although these tumors are characterised with high expression of VEGF, we detected a low amount of blood vessels. This could be explained by the presence of vasculogenic mimicry which turned out to be a good parameter to predict patient survival. Ewing sarcoma cell lines were able to form vasculogenic structures *in vitro* and showed the specific gene expression profile for vasculogenic mimicry positive cells. We analysed the role of VEGF in the stimulation of vasculogenic mimicry, but unfortunately, we could not detect an influence of VEGF on this process. We did find expression of HIF-1 α , a marker for hypoxia, around the observed blood lakes but not around the regular tumor blood vessels. In chapter 6, we further investigated the role of hypoxia and HIF-1 α in vasculogenic mimicry. Microarray analysis comparing aggressive (vasculogenic mimicry positive) cell lines with non-aggressive (vasculogenic mimicry negative) cell lines, revealed a higher expression of several HIF-1 α related genes in the aggressive cell lines. Moreover, hypoxic conditions stimulated the formation of vasculogenic structures *in vitro* and the HIF-1 α protein expression was higher in the aggressive cell lines than in non-aggressive cell lines. Downregulation of HIF-1 α resulted in the downregulation of HIF-1 α downstream genes. Importantly, also the expression of genes related to vasculogenic mimicry were downregulated and a less matrix-invasive phenotype was observed. We concluded that there is a role of hypoxia and HIF-1 α in inducing vasculogenic mimicry and that this knowledge is important to develop new anti-vasculogenic mimicry strategies.

In this thesis, we investigated the role of vasculogenic mimicry in tumor progression. Vasculogenic mimicry is clearly contributing to the aggressiveness of the tumor. These vasculogenic channels form a functional secondary circulation system that is stimulated by hypoxic conditions. This new knowledge on vasculogenic mimicry can contribute to the development of new therapeutic strategies for several types of aggressive tumors.

Samenvatting

De groei van tumoren wordt in sterke mate bepaald door de toevoer van zuurstof en nutriënten. Als een tumor groter wordt dan 2 mm in diameter, gaat deze groeifactoren uitscheiden, waardoor bloedvaten die rond de tumor gelegen zijn, worden gestimuleerd in groei. De vorming van nieuwe vaten uit reeds bestaande, wordt angiogenese genoemd. Angiogenese is niet alleen noodzakelijk voor de groei van tumoren maar maakt ook metastasering van de tumor mogelijk. Zo'n 30 jaar geleden, bij de ontdekking van de eerste angiogene groeifactoren, werd er gepostuleerd dat de inhibitie van angiogenese in tumoren een belangrijke therapeutische uitdaging of zelfs de oplossing zou zijn voor de behandeling van kanker. Naast de aanleg van reguliere bloedvaten, werd in 1999 ontdekt dat ook agressieve tumorcellen in staat zijn om zelf bloedvat-achtige structuren te vormen, een proces dat vasculaire mimicry (nabootsing) wordt genoemd. Dit zorgde voor heel wat ophef in het kankeronderzoek. Omdat deze vaatstructuren kunnen bijdragen aan de bloedcirculatie in de tumor, onafhankelijk van het proces van angiogenese, zijn zij mede verantwoordelijk voor de agressiviteit van de tumor. De aanwezigheid van vasculaire mimicry is daarom een indicatie voor een slechte prognose voor de patiënt. Bovendien bemoeilijkt het proces van vasculaire mimicry het onderzoek aan angiogenese en kan dit een verklaring zijn voor het beperkte succes van de recent ontwikkelde anti-angiogenese therapieën. Deze therapieën zijn immers gebaseerd op het verwoesten van endotheelcellen en laten de tumorcellen ongemoeid. Omdat vasculaire mimicry pas recent ontdekt is, weten we heel weinig over de rol van dit secundaire circulatie systeem in tumoren. In dit proefschrift werd de rol van vasculaire mimicry in de biologie van tumoren bestudeerd.

In hoofdstuk 2 werden de verschillende vaatstructuren in een tumor beschreven. Naast reguliere tumorangiogenese zijn er ook andere vaatstructuren die kunnen bijdragen aan de progressie van de tumor. Intussusceptieve angiogenese, bloedvat co-optie, het rekruteren van endotheelstamcellen, vasculaire mimicry en de aanleg van lymfevaten zijn andere processen die een rol spelen in een tumorgroei. We gaven een overzicht van de verschillende tumorvaatstructuren, de moleculaire mechanismen en de klinische relevantie. Veel onderzoek werd reeds gedaan aan reguliere tumorangiogenese. Mechanismen van de aanleg van andere vaatstructuren zijn minder bekend. Toch dragen deze bij aan de bloedcirculatie in de tumor en vormen daarom targets voor therapie. Een multi-modale antivasculaire strategie zou een goede aanpak kunnen zijn om tumorgroei en metastasering te remmen.

Voor het bestuderen van de relatie tussen vasculaire mimicry, angiogenese en de immunologische reactie in een tumor, werden 58 patiënten geselecteerd met een primair melanoom. Aan de hand van immunohistochemische kleuringen op

tumormateriaal kon er inzicht worden verkregen in de relatie tussen deze drie processen en hun rol in tumorprogressie. In hoofdstuk 3 werd een nieuwe techniek ontwikkeld om de hoeveelheid actieve angiogenese in een tumor te kunnen kwantificeren. Hiervoor werd een immunohistochemische dubbelkleuring uitgevoerd, waarbij zowel de bloedvaten (met CD31/CD34 antilichaam) als de prolifererende cellen (met Ki-67 antilichaam) in een tumor werden aangekleurd. In primaire melanomen vonden we dat de hoeveelheid prolifererende endotheelcellen, of actieve angiogenese, een betere parameter is dan enkel het aantal bloedvaten voor het voorspellen van overleving van patiënten met een primair melanoom.

In hoofdstuk 4 analyseerden we de rol van het ontstekingsinfiltraat (T cellen, cytotoxische T cellen, B cellen, macrofagen, polymorfonucleaire cellen, regulatoire T cellen en geactiveerde lymfocyten) in tumorprogressie en de correlatie met de hoeveelheid actieve angiogenese en de aanwezigheid van vasculaire mimicry. Zowel vasculaire mimicry als de hoeveelheid infiltraat bleken merkers van agressiviteit van de tumor. Bovendien geeft de hoeveelheid geactiveerde lymphocyten ons een duidelijker beeld over de functionaliteit van de immuunreactie in de tumor.

In hoofdstuk 5 beschreven we de aanwezigheid van vasculaire mimicry in het tumortype Ewing sarcoma. Ewing sarcoma is een zeldzame, maar agressieve tumor die gekenmerkt wordt door een grote hoeveelheid (meren van) rode bloedcellen die gelegen zijn tussen tumorcellen. Ondanks dat deze tumoren worden gekenmerkt door hoge expressie van VEGF, vonden we slechts een lage hoeveelheid vaten in de tumoren. Dit bleek te berusten op de aanwezigheid van vasculaire mimicry en was in dit tumortype ook een parameter voor het voorspellen van overleving van een patiënt. Ook *in vitro* maakten Ewing sarcoma cellijnen vasculaire structuren en ze vertoonden het specifieke genexpressieprofiel van vasculaire mimicry. We onderzochten de rol van VEGF in de stimulatie van het proces van vasculaire mimicry. VEGF bleek geen invloed te hebben op het stimuleren van dit proces. We vonden wel expressie van HIF-1 α , een merker voor hypoxie, rond de geobserveerde meren van rode bloedcellen en niet rond de standaard bloedvaten. In hoofdstuk 6 werd de rol van hypoxie en HIF-1 α in vasculaire mimicry verder onderzocht. Uit de analyse van een microarray experiment, waarbij we agressieve (vasculaire mimicry positieve) cellijnen ten opzichte van niet-agressieve (vasculaire mimicry negatieve) cellijnen vergelijken, was er een hogere expressie van meerdere HIF-1 α gerelateerde genen in de agressieve cellijnen. Daarenboven stimuleerden hypoxische condities de vorming van vasculaire structuren *in vitro* en de eiwitexpressie van HIF-1 α was in de agressieve cellijnen ook hoger dan in niet-agressieve cellijnen. Wanneer de expressie van HIF-1 α werd onderdrukt, bleek niet enkel de expressie van HIF-1 α gerelateerde genen lager te zijn, maar ook de expressie vasculaire mimicry gerelateerde genen bleek negatief beïnvloed te worden. Uit deze resultaten kunnen we besluiten dat er een mogelijke rol is van hypoxie en HIF-1 α in de vorming van vasculaire mimicry en dat deze kennis kan gebruikt worden voor het ontwikkelen van anti-vasculaire mimicry strategieën.

In dit proefschrift bestudeerden we de rol van vasculaire mimicry in tumorprogressie. Vasculaire mimicry draagt duidelijk bij tot de agressiviteit van een tumor. Deze tumorvaatstructuren zijn een functioneel secundair circulatiesysteem dat gestimuleerd wordt door hypoxische omstandigheden. Deze nieuwe kennis over het mechanisme van vasculaire mimicry kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapeutische mogelijkheden voor verschillende types van agressieve tumoren.